

アミロ

経費（若手研究者支援）」

とその制御

（学部・助教）、

透析アミロイドーシス等の各種アミロイドーシスを解明し、線維形成を抑制する方法を開発する。アルツハイマー病 Aβ アミロイド線維形成について、試験管内で線維形成を誘起する際に、強力に線維形成を誘起する気液界面を排除することを目指した。これを用いて基底膜成分等の生体分子による線維形成を抑制する。透析アミロイドーシスの原因物質である β2-ミクログロブリン(β2-m) と細胞外シャペロンである α2-マクログロブリンが、試験管内の β2-m アミロイド線維形成の機構を解明しました。

関連キーワード

アミロイド線維・アルツハイマー病・脳アミロイドアンギオパチー・透析アミロイドーシス・細胞外蛋白質品質管理機構

研究の背景および目的

アミロイドは、様々な前駆体蛋白質（約 20 種類）が、天然状態とは異なる立体構造を形成し重合した異常な線維状の構造体であり、細胞外に蓄積しアミロイドーシスと総称される各種疾病の原因となります。

われわれはこれまでに、アルツハイマー病患者脳に認められる Aβ アミロイドーシス、及び長期血液透析患者に発症する β2-ミクログロブリン(β2-m) アミロイドーシスをモデル疾患に選び、試験管内アミロイド線維形成反応系を構築し、これを駆使して様々な生体分子および有機化合物が線維形成過程に及ぼす影響を解析して来しました。

アミロイドーシスの治療と予防法を確立するためには、線維形成機構を解明し、生体を忠実に模倣する試験管内反応系を構築することが重要です。本年度は、アミロイド線維形成・分解の分子論的モデルの構築に関連して、2 種の検討を行いました。

①Aβ アミロイド線維の核形成を誘起する生体分子探索実験系の開発-界面と攪拌の効果-

β アミロイド蛋白質(Aβ)はアルツハイマー病の病因との関連が示されており、また、アミロイド線維を形成し老人斑として患者脳に沈着します。

さらに、脳アミロイド血管症(cerebral amyloid angiopathy)の原因ともなり、脳内出血を引き起こすことが知られています。Aβ モノマーは試験管内でも重合し、アミロイド線維を形成します。このような線維形成を引き起こす生体分子を同定することは、予防・治療法開発の為に重要ですが、試験管内重合反応系を有効に活用することができます。ところが、従来の一般的な試験管内反応系においては、生理濃度に比べて高い濃度のモノマーの使用、気液界面の存在などが不適当であることが明らかになってきました。これらの反応条件を改めて検討し、反応系の改良に取り組みました。

②細胞外シャペロンの β2-m アミロイド線維形成抑制機構の解析：

β2-m アミロイドは、長期血液透析の合併症であり、患者の骨・関節・腱などの組織に沈着します。われわれは昨年度、“細胞外品質管理機構”に関して、血漿中に存在し、変性蛋白質をトラップし凝集を阻止する“細胞外シャペロン”としての α2-マクログロブリン(α2M) が、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 変性 β2-m に特異的に結合し、β2-m アミロイド線維伸長反応を阻害することを明らかにしました。この反応機構を詳細に解析しました。

研究の内容および成果

①Aβ アミロイド線維の核形成を誘起する生体分子探索実験系の開発-界面と攪拌の効果-

われわれは試験管内での重合反応条件を再検討し、Aβ の濃度を 5μM 以下の低濃度にする必要があること、この条件下での Aβ 蛋白質の重合には気液

界面や疎水性界面などが不可欠であり、それらの上で最初に Aβ 蛋白質凝集体が形成されることを示しました。気液界面は線維形成を強力に誘起するため、生体分子による比較的弱い線維形成を観測するためには除去する必要があります。一方、

気液界面を除去しただけでは、攪拌されなくなるために反応が進行しません。そこで本年度は、気液界面を除去した上で、核形成を誘起しにくい攪拌子を見出しました。これにより、低濃度 A β を用いてアミロイド線維を形成させる反応系を構築することができました。これを用いて、基底膜のモデル系である matrigel (ラミニンや4型コラーゲンの混合物)等の各種細胞外マトリクス成分による A β アミロイド線維核形成誘起効果の解析を行い、核形成を促進する成分を定量的に評価することができるようになりました。

②細胞外シャペロンの β 2-m アミロイド線維形成抑制機構の解析：

われわれは、 β 2-m に低濃度の界面活性剤(SDS)を添加して部分変性させることで、 β 2-m アミロイド線維を伸長させる反応系を開発しています。ここに、 α 2M をモル比で 1/200 以上添加すると線維形成を抑制しました(図 1)。電子顕微鏡でもシードとして添加した線維が伸びていないことを確認しました。超遠心分析により α 2M の分子状態の解析を行ったところ、天然状態では殆どテトラマーとして存在する α 2M は、SDS 存在下の変性状態ではかなりの部分がダイマーに解離していることが明らかになりました。 α 2M がダイマー化することで β 2-m との親和性が増した可能性をウエスタンブロット法で検討しました。 α 2M と β 2-m を反応させ、架橋したのちに、ウエスタンブロット法を行いました(図 2)。抗 β 2m 抗体で検出すると、SDS 存在下では、 α 2M ダイマーの位置に濃いバンドが検出され、 α 2M ダイマーと β 2-m が強く相互作用していることが明らかになりました。以上のことから、 α 2M はダイマーに解離することで β 2-m との親和性が増したと考えられます。以上のように、通常はテトラマーとして存在し、天然構造の β 2-m と弱く相互作用する α 2M は、蛋白質が変性し凝集しやすい環境下ではダイマーへと構造変化し、変性 β 2-m に対する親和性を高めることで、アミロイド線維形成

を抑制することを示しました。この機構により、 α 2M は細胞外蛋白質品質管理機構の一端を担っていることが推定されます。細胞外シャペロンの蛋白質品質管理機構を詳細に理解することは、アミロイドーシスの予防・治療法の開発に繋がると期待されます。

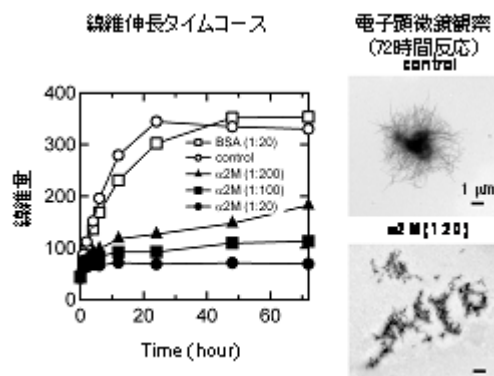


図 1 α 2-マクログロブリンによる β 2-mアミロイド線維伸長反応の抑制

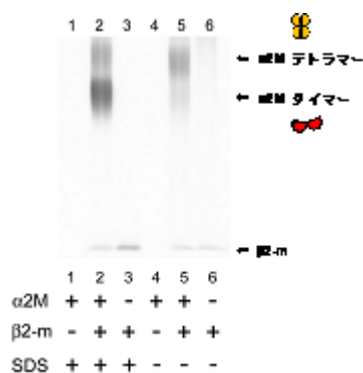


図 2. 蛋白質変性環境下における α 2-マクログロブリンのダイマー化と、部分変性 β 2-m の結合

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Ozawa D, Hasegawa K, Lee YH, Sakurai K, Yanagi K, Ookoshi T, Goto Y, Naiki H., Inhibition of β 2-microglobulin amyloid fibril formation by α 2-macroglobulin. J Biol Chem (2011) 286, 9668-9676.

国際学会: Morinaga A, Hasegawa K, Nomura R, Ookoshi T, Ozawa D, Goto Y, Yamada M, Naiki H. The role of interfaces and agitation on the fibril formation of amyloid β -protein. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010. Hawaii, July 10-15, 2010.

「特記事項」 本研究は、金沢大学大学院 脳老化・神経病態学（神経内科学）山田正仁教授、な

らびに大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質構造生物学研究部門 後藤祐児教授との共同研究により行われました。

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究 (タンパク質社会) (領域番号 526)・平成 22-23 年度・アミロイド線維形成を制御する生体分子環境及び線維沈着による細胞障害機構の解明・研究分担者 (代表内木 宏延)・採択・6,400 千円。その他科学研究費補助金: 採択、基盤 B(研究分担者)、基盤 C(研究代表者)、各 1 件。申請中、基盤 C。